

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭60-109599

⑬ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和60年(1985)6月15日

C 07 K 7/08
7/40
G 01 N 33/534
33/78

6464-4H
6464-4H
7906-2G
8305-2G

※審査請求 未請求 発明の数 1 (全12頁)

⑮ 発明の名称 インスリン様成長因子-I (IGF-I) 測定用ペプチド

⑯ 特 願 昭58-69774

⑰ 出 願 昭58(1983)4月19日

特許法第30条第1項適用 昭和58年4月20日、日本内分泌学会発行の「日本内分泌学会雑誌 第59巻 第4号昭和58年」において発表

⑱ 発 明 者	井 上 健	神戸市西区伊川谷町有瀬131-2-907
⑱ 発 明 者	吉 田 信 男	西宮市甲子園三番町5-8
⑱ 発 明 者	中 村 益 久	豊中市西緑丘1-3-1-707
⑱ 発 明 者	河 野 昌 雄	茨木市鮎川3-25-28
⑱ 発 明 者	鎮 目 和 夫	東京都渋谷区代々木3丁目28
⑱ 発 明 者	對 馬 敏 夫	東京都品川区大崎3-13-13
⑲ 出 願 人	塩野義製薬株式会社	大阪市東区道修町3丁目12番地
⑳ 代 理 人	弁理士 岩崎 光隆	

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

インスリン様成長因子-I (IGF-I) 測定用ペプチド

2. 特許請求の範囲

チロシンが放射性ヨウ素で標識されていてもよい下式のオクタデカペプチド。

H-Tyr-Phe-Asp-Lys-Pro-Thr-Gly-Tyr-Gly-Ser-Ser-Ser-Arg-Arg-Ala-Pro-Gln-Thr-OH
(ただし、式中各アミノ酸はL型である。)

3. 発明の詳細な説明

本発明はインスリン様成長因子-I (IGF-I) 測定用ペプチドに関する。更に詳しくはインスリン様因子-I (以下IGF-Iと略記する) の24位から4/位に相当するオクタデカペプチドの類似体に関するものである。

IGF-Iは成長ホルモン依存性の成長因子でソマトメジンCと同一物質と考えられており、同物質の血中濃度を測定することにより、巨人症、先端巨大症、下垂体機能低下症、下垂体性小人症な

どの診断が容易となる。それ故、同物質の簡便かつ精度のよい測定法の確立が強く望まれていた。その結果、抗IGF-I抗体を用いた感度および精度のよいラジオイムノアッセイが開発されたが、同測定法の実施に必須であるIGF-I標品が微量しか入手できず、したがって同測定法は一般臨床医が手軽に実施しうるものではなかった。ついで、HintzらがIGF-Iの30位から4/位に相当するドデカペプチド、いわゆるCペプチド部分を合成し、同ペプチドの抗体および放射活性ドデカペプチドを作製してIGF-Iを使用しないラジオイムノアッセイを試みた[J. Clin. Endo. Metab. 55, 928(1982)]。しかし、同測定法を臨床試験として用いるには、今一つ感度に難点があつた。

本発明者らは、今般IGF-Iの26位のアスパラギンをアスパラギン酸に代えてIGF-Iの24位から4/位に相当するオクタデカペプチドを合成し、これに対する抗体および放射性ヨウ素標識ペプチドを作製してIGF-Iの測定を試み

たところ、本測定法は精度および感度に問題はなく、臨床検査法あるいはIGF-Iの純化の手段として利用しうるものであることが確認された。

従つて、本発明は、上記のオクタデカペプチド、その放射性ヨウ素標識物および抗オクタデカペプチド抗体ならびにこれらの物質の製造法を提供するものである。さらに、これらを用いたラジオイムノアッセイをも提供するものである。

本発明にかかるオクタデカペプチドは上記のようにIGF-Iの26位のアスパラギンをアスパラギン酸に代えた24位から41位のオクタデカペプチド、すなわち、 $[Asp^{24}]-IGF-I-(24-41)$ (以下オクタデカペプチド(I)と記す)であり、下記のアミノ酸配列を有する。

H-Tyr-Phe-Asp-Lys-Pro-Thr-Gly-Tyr-Gly-Ser-Ser-Ser-Arg-Arg-Ala-Pro-Gln-Thr-OH
(I)

(ただし、式中各アミノ酸はL型である。)

上記オクタデカペプチド(I)はペプチド合成分野で用いられる化学合成法および酵素合成法によ

などが利用できる。カルボキシ保護基としては、メチルエステル(OMe)、tert-ブチルエステル、ベンジルエステル(OBzl)などのエステル、アミド、置換アミド、ヒドラジド、例えば、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド(N_2H_2-Z)、または塩などが例示される。アミノ基以外の側鎖官能基も必要に応じて、tert-ブトキシ(Bu^tO)、ベンジル(Bzl)、トシル(Tos)など、ペプチド合成で通常用いられる保護基で保護しておくことよい。保護基については、E. Grossら「The Peptides Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 3, Protection of Functional Groups in Peptide Synthesis」(1981年、Academic Press)、赤堀四郎ほか編「タンパク質化学」405頁(昭和49年、共立出版)およびM. Bodanszkyら「Peptide Synthesis」(1976年、John Wiley & Sons Inc.)に詳しく記載されている。液相法で合成する場合は、アジド法、混合酸無水物法、活性エステル法、カルボジイミド法などの常法により実施する。固相法で合成する場合は、通常用いられているセルロース、ポリビニルアルコール、ポ

リ合成しうる。前者においては、液相法および固相法の両方法を単独でまたは組合せて用いることが可能である。すなわち、上記ペプチドの配列に従つて固相法で合成してもよいし、合成に都合のよいフラグメントを決定して、液相法、固相法またはペプチド合成酵素によりフラグメントを合成したのち、各フラグメントを縮合させて目的の化合物(I)とすることができる。これらの合成の反応条件、反応時間等またはペプチド合成に通常用いられるものを踏襲すればよい。

用いるアミノ酸およびペプチドのアミノ末端およびカルボキシ末端は汎用される保護基により必要に応じて保護する。アミノ保護基として、例えば、ベンジルオキシカルボニル(Z)、tert-ブトキシカルボニル(Boc)、tert-メトキシベンジルオキシカルボニル(Z(OMe))、tert-アミノオキシカルボニル(Aoc)、ノーマチルシクロヘキシルオキシカルボニル(Mhoc)、ノーマチルシクロペンチルオキシカルボニル、9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)、ホルミル、トリフルオロアセチル

リメタクリレート、ポリスチレン等を担体として用いることよい。例えば、クロロメチル化ースチレンージビニルベンゼンコポリマー[Merrifield: J. A. C. S. 85, 2149(1963)]のような修飾されたポリスチレンを担体として用いることが可能である。また酵素により合成を行う場合は、例えば、トリプシン(特開昭53-62896号公報)、キモトリプシン(特開昭52-108089号公報)、ペプシン、パペイン、サブチリシン、サーモリシン(特開昭54-64692号公報)、カルボキシペプチダーゼ、その他細菌由来酵素(特公昭57-46360号公報)などをそのまま又は固定化酵素として用いて実施する。

かくして得られたオクタデカペプチド(I)は、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー、向流分配法、電気泳動法、などにより抗原として用いうるに十分な高純度まで精製する。

オクタデカペプチド(I)をラジオイムノアッセイ用の標識抗原とするには、常法により放射性ヨ

ウ素 (^{125}I または ^{131}I) でチロシン残基をヨウ素化することにより行なう。すなわち、放射性ヨウ素標識法として広く用いられている塩化ヨウ素法 [Grossberg et al.: Biochemistry 1, 391 (1962)] またはクロラミンT法 [Greenwood et al.: Biochem. J. 59, 114 (1963)] などにより容易に調製しうる。

オクタデカペプチド (I) の抗体は、オクタデカペプチド (I) を担体蛋白質に結合させた後、適当な免疫動物に免疫し調製する。担体蛋白質として、例えば、血清アルブミン、チログロブリン、アスカリス蛋白質などの常用されている蛋白質を用いてオクタデカペプチド (I) と結合させる。結合剤として、EDC [ノ-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩]、グルタルアルデヒドなどを用いるとよい。得られたオクタデカペプチド (I) 結合蛋白質をウサギ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ニワトリ、サル、イヌ、モルモットなどの適当な動物に免疫し、抗血清を得る。注射方法、免疫頻度、免疫量は用いる動物の抗体

産生能に応じて決定する。注射時には、各種のアジュバント (例えば、フロインドのコンブリートアジュバント) を加えて投与するとより抗体が産生されやすい。得られた抗血清は過熱滅菌、防腐剤添加、凍結または凍結乾燥などの処理を施し保存し、用時希釈して用いる。本発明者が参考例に示す方法で作製した抗オクタデカペプチド (I) 抗体は最終希釈度 2000~7500 倍で使用した。同方法で得た抗オクタデカペプチド抗体と実施例2で得られた放射性ヨウ素標識オクタデカペプチド (I) を用いて得た標準曲線は図1に示すとおりである。

本発明で得た抗体と放射活性抗原を用いたラジオイムノアッセイにおいては図2に示すようにインスリン、MSA (Multiplication stimulating Activity) は影響を及ぼさない。また IGF-I と II を共に含むと考えられているソマトメジン A もこの系に反応を示すことから、同法は臨床検査法として用いうるものである。

なお、上記ラジオイムノアッセイを用いて、ヒ

ト血清中の IGF-I 様活性を測定した実験結果を以下に示す。

実験方法

(1) 血清処理方法

ヒト血清 1 ml に対し 4 ml のエタノール-塩酸 (エタノール 87.5 : 2 N 塩酸 12.5 v/v) を混和後 4℃、30分、3000 rpm で遠沈し、上清を蒸留水に対して透析したのち凍結乾燥する。得られた粉末を 0.01 M 酢酸 1 ml に溶解し、不溶物を遠去沈除する。同溶液 50~100 μl を用いて血中 IGF-I 様活性を測定した。

(2) 測定法

抗体 (1:2000) 0.1 ml

50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) 0.2 ml

オクタデカペプチド (I) 標準品または

試験検体 0.1 ml

^{125}I 標識オクタデカペプチド (I) 0.1 ml

(* 牛血清アルブミン 0.1 %、塩化マグネシウム 10 mM、アジ化ナトリウム 0.02 %、EDTA 1 mM を含有、同緩衝液は他の試薬の希釈剤とし

ても用いた。)

前三者を混和し 4℃ で 6 時間反応させ、ついで ^{125}I 標識物を加えて 4℃ で 18 時間反応させる。反応液 0.5 ml に 0.2 % 牛ガンマグロブリン 0.5 ml を加えついで氷冷した 2.5 % ポリエチレングリコール溶液 1 ml を添加、混和後 4℃ で 30分、3000 rpm で遠沈し、上清を除去、沈渣を 0.5 mM トリス-塩酸緩衝液で洗浄後放射活性を測定した。

なお、血中 IGF-I 様物質の濃度はオクタペプチド (I) 相当として表現した。

(3) 結果

正常人 10 名、末端肥大症患者 12 名、下垂体機能低下症患者 12 名の各血清を測定して得た測定値は下表に示すとおりである。

(以下余白)

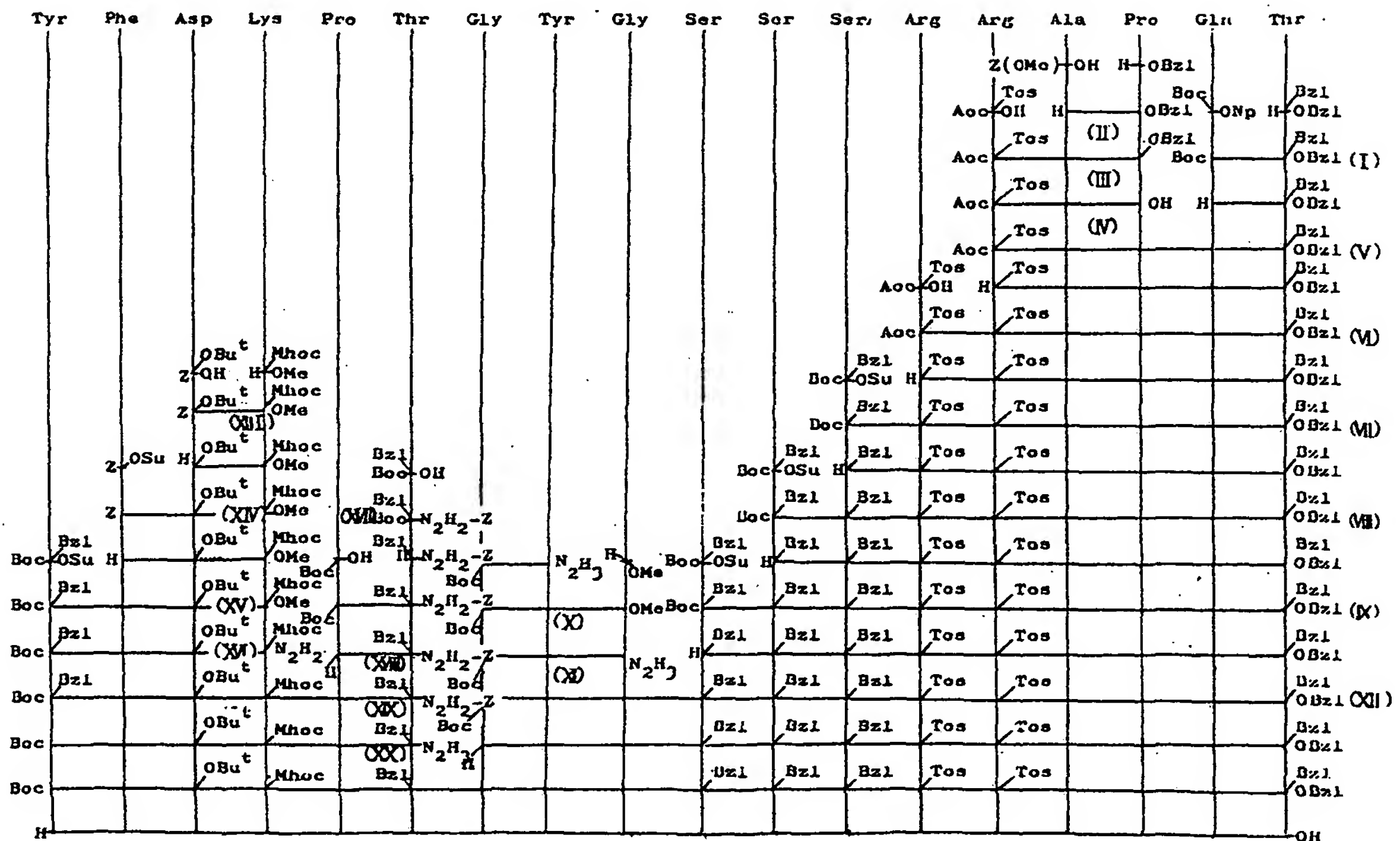
症 例	血中濃度測定値 (fmol/ml)		
	正 常 人	末端肥大症患者	下垂体機能低下症患者
1	150	810	200
2	500	1500	420
3	510	900	530
4	410	520	240
5	450	800	210
6	550	950	400
7	250	1100	100
8	400	640	50
9	260	950	50
10	174	610	160
11	—	610	500
12	—	825	225
平均値	425±160	851±255	257±159

以下に実施例により本発明の実施態様を示すが、これら実施例はなんら本発明を限定するものではない。

实施例 1

オクタデカペプチド (I) を下図に従い合成する。

ただし、アミノ酸はすべてL型を意味する。



(1) Boc-Gln-Thr(Bzl)-OBzl(I):

オーベンジルスレオニン・ベンジルエステル・シユウ酸塩 6.89g をジメチルホルムアミド (DMF) 60 ml に懸濁し氷冷。これにトリエチルアミン 2.80 ml と α -ブトキシカルボニルグルタミン・p-ニトロフェニルエステル [Boc-Gln-ONp] 7.35g とを加え一夜冷置 (4°C) する。DMF を減圧留去後、残渣を酢酸エチルに溶解し、氷冷した 1M 塩酸 (30 ml \times 2)、水 (30 ml) で洗浄後、さらに 1M アンモニア水 (25 ml \times 6) で洗い、ついで硫酸マグネシウム上で乾燥する。溶媒留去後、残渣を酢酸エチル-エーテルから結晶化させて標記化合物 (I) 7.65g を得る。収率 72%、mp 101-102°C、 $[\alpha]_D^{25} -240 \pm 26^\circ$ (c 1.0, メタノール)。

(2) H-Ala-Pro-OBzl・塩酸塩(II):

ブロリン・ベンジルエステル 8.47g と α -メトキシベンジルオキシカルボニル・アラニン [Z(OMe)-Ala-OH] 1.013g とをジクロロメタン中 N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミ

固体として標記化合物 III 1.353g を得る。少量のジシクロヘキシル尿素 (DCU) の混在を認めるほかは薄層クロマト (TLC) で単一 (シリカゲル F₂₅₄・クロロホルム-メタノール (9:1)、検出は硫酸又は臭化水素酸-ニンヒドリン法)。

(4) Aoc-Arg(Tos)-Ala-Pro-OH(IV):

化合物 III 3.10g を酢酸エチルに溶かし、パラジウム黒を触媒として 18 時間接触還元する。溶媒留去後、残渣を酢酸エチル-エーテルから沈澱させて標記化合物 IV 2.45g を得る。収率 73%、 $[\alpha]_D^{26} -5.26 \pm 0.9^\circ$ (c 1.0, メタノール)。

(5) Aoc-Arg(Tos)-Ala-Pro-Gln-Thr(Bzl)-OBzl(V):

化合物 I 1.15g を 4M 塩化水素/ジオキサン 5 ml に溶かし、25°C、1 時間反応させる。溶媒を留去後エーテルを加えて生じる沈澱を濾取して H-Gln-Thr(Bzl)-OBzl 塩酸塩 1.1g を得る。これと化合物 IV 1.20g とを、ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) 0.35 ml および

D (DCC) 8.25g を用いて縮合させ、反応液を常法通り処理して Z(OMe)-Ala-Pro-OBzl (前状) 1.87g を得る。次いでこれを 4M 塩化水素/ジオキサン 40 ml に溶かし 25°C に 30 分間静置後、エーテルを加えて生じる沈澱を濾取して標記化合物 (II) 1.81g を得る。メタノール-エーテルから再結晶して 1.30g、収率 90%、mp 176-177°C 分解、 $[\alpha]_D^{25} -95.5 \pm 1.3^\circ$ (c 1.0, メタノール)。

(3) Aoc-Arg(Tos)-Ala-Pro-OBzl(III):

1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) 2.70g をアセトニトリル 100 ml に加温溶解させる。室温まで冷却後 α -アミルオキシカルボニル-N^G-トシル・アルギニン [Aoc-Arg(Tos)-OH] 8.85g とトリエチルアミン 2.80 ml を添加、さらに化合物 II 6.26g を一度に加える。得られた澄明な溶液に DCC 4.13g のアセトニトリル溶液を加え、水道水で冷却しつつ、暫時攪拌、ついで 4°C に一夜冷置する。この反応液を常法通り処理することにより、非結晶性

HOBt 0.27g と共にテトラヒドロフラン (THF) 20 ml に溶解し氷冷、これに DCC 0.41g を加える。この反応液を 4°C で 20 時間攪拌後、常法通り処理して標記化合物 V の粗生成物 2.4g を得る。これをシリカゲルカラムクロマトに付し (シリカゲル H 40g)、クロロホルム-メタノール (9.5:0.5) で溶出する。生成物を酢酸エチル-エーテルから沈澱させて標記物 V 1.56g を得る。収率 76%、mp 103-105°C、 $[\alpha]_D^{25} -65.1 \pm 1.0^\circ$ (c 1.0, メタノール)。

(6) Aoc-Arg(Tos)-Arg(Tos)-Ala-Pro-Gln-Thr(Bzl)-OBzl(VI):

化合物 V 2.06g を 4M 塩化水素/ジオキサン 30 ml に溶解、25°C で 1 時間反応させる。エーテルを加えて生じる沈澱を濾取して H-Arg(Tos)-Ala-Pro-Gln-Thr(Bzl)-OBzl 塩酸塩を得る。これと α -アミノオキシカルボニル-N^G-トシルアルギニン [Aoc-Arg(Tos)-OH] 1.33g とを HOBt 0.41g、ジイソプロピル

エチルアミン(DIEA) 0.52 mlと共にDMF 20 mlに溶解し氷冷する。この溶液にDCC 0.62 gを加えて4℃で1夜攪拌したのち常法通り後処理を行って、標記化合物VIの粗製品を得る。これをシリカゲルカラムクロマトに付し(シリカゲルH 50 g)、クロロホルム-メタノール(95:5から85:15まで連続的に変える)で溶出する。主成分を集め、メタノール-エーテルから沈澱させて標記物VI 1.55 gを得る。収率58%、mp 123-125℃、 $[\alpha]_D^{25} -51.6 \pm 0.9^\circ$ (c 1.0, メタノール)。

(7) Boc-Ser(Bzl)-Arg(Tos)-Arg(Tos)-Ala-Pro-Gln-Thr(Bzl)-OBzl(VI):

化合物VI 1.5 gにアニソール0.2 mlを含む三弗化酢酸(TFA) 1.5 mlを加え、0℃で1時間反応させる。TFAを減圧留去、残渣にエーテルを加え、生じた沈澱を濾取してH-Arg(Tos)-Arg(Tos)-Ala-Pro-Gln-Thr(Bzl)-OBzl・TFA塩を得る。これをDMF 1.5 mlに溶解し、DIEA 0.25 mlを添加後[α -ブトキシカルボニ

OSu 0.49 gと反応させて標記化合物X 1.75 gを得る。収率99%、mp 105-108℃、 $[\alpha]_D^{25} -37.4 \pm 0.7^\circ$ (c 1.0, メタノール)。

(8) Boc-Gly-Tyr-Gly-OMe(X):

Boc-Gly-Tyr-NHNH₂ (大塚ら、Bull. Chem. Soc. Jpn., 39, 1171 (1966) に従って調製) 1.05 gをDMF 30 mlに溶かして-10~-15℃に冷却、これに4M塩化水素/ジオキサン3 mlを加えたのち亜硝酸イソアミル0.43 mlを滴下する。同温度で10分間反応後-30~-40℃に冷却し、トリエチルアミン2.09 mlを添加し中和する。こうして得られたBoc-Gly-Tyr-N₃の溶液にグリシン・メチルエステル・塩酸塩0.375 gを加えて0℃で20時間反応させる。溶媒を減圧留去し、残渣を常法通り処理して標記化合物Xの粗生成物を得る。エーテルから再結晶して1.05 g、収率85%、mp 157-158℃、 $[\alpha]_D^{25} -54 \pm 0.4^\circ$ (c 1.0, メタノール)。

(9) Boc-Gly-Tyr-Gly-NHNH₂(X):

ル-0-ベンジル-セリン-N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル Boc-Ser(Bzl)-OSu] 0.57 gを加えて25℃に1夜静置する。溶媒を減圧留去後残渣に水を加え生じる沈澱を濾取、乾燥。これを酢酸エチル-エーテルから再沈澱を繰返して、標記化合物VII 1.61 gを得る。収率95%、mp 110-112℃、 $[\alpha]_D^{25} -48.0 \pm 0.9^\circ$ (c 1.0, メタノール)。

(8) Boc-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Arg(Tos)-Arg(Tos)-Ala-Pro-Gln-Thr(Bzl)-OBzl(VII):

化合物VII 1.6 gを上掲(7)と全く同様TFA/アニソールで処理後 Boc-Ser(Bzl)-OSu 0.54 gと反応させて標記化合物VIII 1.70 gを得る。収率100%、mp 110-112℃、 $[\alpha]_D^{25} -44.3 \pm 0.8^\circ$ (c 1.0, メタノール)。

(9) Boc-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Arg(Tos)-Arg(Tos)-Ala-Pro-Gln-Thr(Bzl)-OBzl(X):

化合物VIII 1.6 gを上掲(7)と全く同様TFA/アニソールで処理し、さらに Boc-Ser(Bzl)

化合物X 1.0 gをエタノール30 mlに溶解し、抱水ヒドラジン0.5 mlを加えて25℃に20時間静置する。析出した結晶を濾取し、熱エタノールで処理して標記化合物XI 1.0 gを得る。収率98%、mp 71-72℃(分解)、 $[\alpha]_D^{25} -64 \pm 0.5^\circ$ (c 1.0, DMF)。

(10) Boc-Gly-Tyr-Gly-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Arg(Tos)-Arg(Tos)-Ala-Pro-Gln-Thr(Bzl)-OBzl(XI):

化合物X 0.56 gを上掲(7)と同様TFA/アニソールで処理してH-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Arg(Tos)-Arg(Tos)-Ala-Pro-Gln-Thr(Bzl)-OBzl・TFA塩を得る。一方、化合物XI 0.17 gを上掲(10)に記載の方法に従って亜硝酸イソアミルで処理して、Boc-Gly-Tyr-Gly-N₃のDMF溶液を得る。この両者を合一し、4℃で3日間攪拌したのち溶媒を減圧留去する。残渣に水20 mlを加えて生じる沈澱を濾取し、氷酢酸から凍結乾燥する。得られた粉末をエタノール10 mlに懸濁し1夜放置後濾別

する。これを乾燥して標記化合物XII 0.565gを得る。収率96%。 $[\alpha]_D^{22.5} - 32.4 \pm 2.6^\circ$ (c 0.3, 酢酸)。

03 Z-Asp(OBu^t)-Lys(Mhoc)-OMe(XIII):

N^α-ベンジルオキシカルボニル-N^ε-ノーマチルシクロヘキシルオキシカルボニル-L-リジン・メチルエステル(Z-Lys(Mhoc)-OMe)(井上ら, Bull. Chem. Soc. Jpn., 49, 3620(1976))に記載の方法で調製し4.5gを5%酢酸/メタノール中、パラジウム黒を触媒として7時間接触還元したのち溶媒を減圧留去する。残渣をジクロロメタンに溶かして氷冷し、これに氷冷した50%炭酸カリを加えて振り中和する。ジクロロメタン層を乾燥後、低温減圧下に乾固して油状のH-Lys(Mhoc)-OMeを得る。一万、N^α-ベンジルオキシカルボニル-β-ヒューブチル-アスパラギン酸・ジシクロヘキシルアミン塩(Z-Asp(OBu^t)-OH·DCHA) 5.25gを50%エタノール中ダウエツクス50WX8(商品名、ダウケミカル)(H⁺型)10ccで処理後溶

し、クロロホルム-メタノール(98:2)で溶出する。TLCで単一な主成分を集め留去。残渣をエーテル-石油エーテルから結晶化して標記化合物XIV 6.19gを得る。収率82%。mp 77-78°C。 $[\alpha]_D^{24} - 18.1 \pm 0.4^\circ$ (c 1.0, メタノール)。

04 Boc-Tyr(Bzl)-Phe-Asp(OBu^t)-Lys(Mhoc)-OMe(XV):

化合物XIV 5.89gを5%酢酸/メタノール中パラジウム黒を触媒として6時間接触還元してH-Phe-Asp(OBu^t)-Lys(Mhoc)-OMe・酢酸塩を得る。これをDMF 50mlに溶解し、Boc-Tyr(Bzl)-OSu 4.04gを加えて25°Cで20時間反応させる。溶媒を減圧留去後、残渣を常法通り処理して得た生成物を酢酸エチル-エーテルから再沈澱して非晶形の標記化合物XV 5.04gを得る。収率67%。mp 71-72°C。 $[\alpha]_D^{22.5} - 19.6 \pm 0.6^\circ$ (c 1.0, メタノール)。

05 Boc-Tyr(Bzl)-Phe-Asp(OBu^t)-Lys(Mhoc)-NHNH₂(XVI):

溶媒を減圧留去する。残渣をエーテルに溶解、乾燥後乾固して油状のZ-Asp(OBu^t)-OHを得る。この両者を酢酸エチル20mlに溶解して氷冷、これにDCC 2.14gを加えて4°Cで20時間攪拌する。析出したDCUを濾別後溶媒を減圧留去して油状残渣を得る。これをシリカゲルカラムクロマトに付し(シリカゲルH, 100g)、クロロホルム-メタノール(98:2)で溶出する。TLCで単一な成分を集め、溶媒を留去して油状の標記化合物XII 7.5gを得る。 $[\alpha]_D^{23} - 2.6 \pm 0.4^\circ$ (c 1.0, メタノール)。

04 Z-Phe-Asp(OBu^t)-Lys(Mhoc)-OMe(XVII):

化合物XII 7gを5%酢酸/メタノールに溶解し、パラジウム黒を触媒として7時間接触還元してH-Asp(OBu^t)-Lys(Mhoc)-OMe・酢酸塩を得る。これをDMF 30mlに溶かし、Z-Phe-OSu 3.96gを加えて25°Cで20時間反応させる。溶媒を減圧留去し、残渣を常法通り処理して結晶性の生成物7.5gを得る。これをシリカゲルカラムクロマトに付し(シリカゲルH, 100

化合物XV 4.25gをエタノール50mlに溶解し、これに飽和ヒドラジン5mlを加えて25°Cに20時間静置する。析出した結晶性沈澱を濾取し、さらにエタノールから再結晶して標記化合物XVI 3.68gを得る。収率87%。mp 177-178°C。 $[\alpha]_D^{22.5} - 16.1 \pm 0.5^\circ$ (c 1.0, DMF)。

07 Boc-Thr(Bzl)-NHNH-Z(XVIII):

O-ベンジル-N-ヒューブトキシカルボニル-スレオニン, Boc-Thr(Bzl)-OH, 2.45gとベンジル・カルバゼート, Z-NHNH₂, 1.31gとを酢酸エチル20mlに溶解し、これにDCC 1.63gを加えて4°Cで20時間攪拌する。析出したDCUを濾別後、濾液は常法通り沈澱、減圧乾固する。結晶性残渣をエーテル-石油エーテルから再結晶して、標記化合物XVII 3.07gを得る。収率85%。mp 77-78°C。 $[\alpha]_D^{23} - 8.1 \pm 0.5^\circ$ (c 1.0, メタノール)。

08 H-Pro-Thr(Bzl)-NHNH-Z・塩酸塩(XIX):

化合物XVII 3.0gを20% TFA/ジクロロメタ

ンに溶解し、25℃に1時間静置する。溶媒留去後、残渣をジクロロメタンに溶かして氷冷、50%炭酸カリと振って中和する。ジクロロメタン層を乾燥後減圧乾固してH-Thr(Bzl)-NHNH-Zを得る。これをBoc-Pro-OH 1.4/gと共に酢酸エチル50mlに溶解しDCC 1.35/gを加えて4℃で20時間攪拌する。この反応液を常法通り処理して得られる生成物をシリカゲルカラムクロマトに付し(シリカゲルH、90g)、クロロホルム-メタノール(98:2)で溶出する。主成分を集め減圧乾固して油状のBoc-Pro-Thr(Bzl)-NHNH-Zを得るが、直ちに20%TFA/ジクロロメタン50mlを加え、25℃に1時間静置する。溶媒留去後残渣に1M塩酸20ml、メタノール10mlおよびローブタノール10mlの混液を加えて減圧乾固する。得られた残渣にエーテルを加え、生じた結晶を濾別すると標記化合物XVI 3.02/gを得る。収率92%、mp 103-104℃、 $[\alpha]_D^{25} -329 \pm 0.8^\circ$ (c 1.0, メタノール)。

得る。このものをシリカゲルカラムクロマトに付し(シリカゲルH、50g)、クロロホルム-メタノール(95:5および90:10)で溶出する。主成分を集め、溶媒留去後残渣をエーテルから沈澱させて標記化合物XX 0.67/gを得る。収率56%、mp 111-112℃、 $[\alpha]_D^{26} -420 \pm 0.9^\circ$ (c 1.0, メタノール)。

なお、主成分に続いて2つの画分が得られ、それぞれから結晶性物質を分離する(aおよびb)。NMRスペクトルの解析によれば、a(40mg)はBoc-Tyr(Bzl)-Phe-Asp(OBu^t)-Lys(Mhoc)-Pro-Thr-NHNH₂、b(170mg)はBoc-Tyr-Phe-Asp(OBu^t)-Lys(Mhoc)-Pro-Thr-NHNH₂である。

- (2) H-Tyr-Phe-Asp-Lys-Pro-Thr-Gly-Tyr-Gly-Ser-Ser-Ser-Arg-Arg-Ala-Pro-Gln-Thr-OH, $[\text{Asp}^{26}]$ -IGF-I-(24-4):

化合物VII 1/gをアニソール1mlを含むTFA 10mlに溶解し、0℃に1時間静置する。TFAを減圧留去し、残渣にエーテルを加えて生じる

- (3) Boc-Tyr(Bzl)-Phe-Asp(OBu^t)-Lys(Mhoc)-Pro-Thr(Bzl)-NHNH-Z(XX):

化合物XVI 1.94/gを上掲(1)に記載の方法に従って亜硝酸イソアミルで処理することにより、Boc-Tyr(Bzl)-Phe-Asp(OBu^t)-Lys(Mhoc)-N₃のDMF溶液を得る。これに化合物XVII 1.00/gを加え、4℃で20時間攪拌したのち溶媒を減圧留去する。残渣に水50mlを加えて生じる沈澱を濾取し、シリカゲルカラムクロマトに付し(シリカゲルH、90g)、クロロホルム-メタノール(95:5)で溶出する。主成分を集め、溶媒留去後酢酸エチル-エーテルから固く化させて、標記化合物XX 1.45/gを得る。収率52%、mp 135-136℃、 $[\alpha]_D^{25} -379 \pm 0.6^\circ$ (c 1.0, メタノール)。

- (4) Boc-Tyr-Phe-Asp(OBu^t)-Lys(Mhoc)-Pro-Thr(Bzl)-NHNH₂(XX):

化合物XX 1.40/gをメタノールに溶解し、パラジウム黒を触媒として25℃で7時間接触還元する。溶媒を減圧留去して粗生成物1/gを

沈澱を濾取してH-Gly-Tyr-Gly-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Arg(Tos)-Arg(Tos)-Ala-Pro-Gln-Thr(Bzl)-OBzl・TFA塩1/3/gを得る。

化合物XX 0.52/gを上掲(1)に記載の方法により亜硝酸イソアミルで処理、Boc-Tyr-Phe-Asp(OBu^t)-Lys(Mhoc)-Pro-Thr(Bzl)-N₃のDMF溶液を得る。この溶液に、上に得られるドデカペプチドTFA塩を加え、4℃で20時間攪拌し反応させる。溶媒を減圧留去したのち水50mlを加え、不溶性沈澱を濾取する。これを酢酸から凍結乾燥後、エタノール20mlに懸濁して1夜25℃に静置する。沈澱を濾取し乾燥することによりBoc-Tyr-Phe-Asp(OBu^t)-Lys(Mhoc)-Pro-Thr(Bzl)-Gly-Tyr-Gly-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Arg(Tos)-Arg(Tos)-Ala-Pro-Gln-Thr(Bzl)-OBzl 1.2/gを得る。収率96%。TLC(シリカゲル)で単一(溶媒はクロロホルム-メタノール-酢酸(85:15:3)、検出は硫酸による

炭化法)。

上に得た保護ペプチド1.2gをアニソール10mlとよく混ぜ合わせ、これに酢化柳化水素15mlを加えて0℃で1.5時間攪拌する。次いで氷冷下に柳化水素を減圧留去し、残渣に水50ml、エーテル50mlを加えて振盪する。水層はさらにエーテルで洗浄後、約20mlまで減圧濃縮してからカルボキシメチルセルローズ(ワットマンCM-52)のカラム(2.6×20cm)に載せ、0~0.3Mの直線的濃度勾配を有する酢酸アンモニウム緩衝液(pH6.5, 1.5%)で溶出する。フラクション・コレクターにより9.5mlずつに分画し、275nmで追跡する(図3)。画分75~90に主ピークが見られ、これを集めて減圧乾固、残渣を凍結乾燥すると、標記オクタデカペプチドQ745gを得る。収率96%、 $[\alpha]_D^{25} -7.05 \pm 1.8^\circ$ (c0.6, 水)。アミノ酸分析値(カッコ内は理論値): 1)酸加水分解物 Lys 1.00(1), Arg 2.00(2), Asp 1.02(1), Thr 1.97(2), Ser 2.79(3), Glu 1.03(1),

50mM, n-ブタンスルホン酸ナトリウム5mMを含む50mM酢酸緩衝液(pH3.0); 流速, 1ml/分; 検出, 220nm。

実施例2

0.5Mリン酸緩衝液(PBS)(pH7.5)50μl。実施例1で得られたオクタデカペプチド(1)の0.5M PBS溶液(1μg/20μl), Na^{125}I の0.1N水酸化ナトリウム溶液(1mCi/10μl), およびクロラミンTの0.5M PBS溶液(20μg/10μl)を混合し、30秒攪拌後メタ重亜硫酸ナトリウム12.5μg含有0.1M PBS(pH7.4)50μlを加えて反応を停止する。1%牛血清アルブミンを含む0.1M PBS10μlおよび10%ヨウ化カリ水溶液10μlを加えた後、セファデックスG10(商品名、ファルマシア社)のカラム(1×25cm)にかけ、0.1M酢酸にてゲル濾過を行い、フラクション№9~15に ^{125}I 標識-[Asp²⁴]-IGF-I-(24-41)を得た(図5)。得られた ^{125}I 標識物の比活性は420μCi/μgであつた。

Pro 1.67(2), Gly 2.05(2), Ala 1.03(1), Tyr 2.00(2), Thr 1.00(1); 回収率76.5%。2)アミノペプチダーゼM消化物 Lys 0.56(1), Arg 1.41(2), Asp 1.00(1), Thr+Gln 2.43(3), Ser 3.06(3), Pro 1.66(2), Gly 2.05(2), Ala 1.06(1), Tyr 2.02(2), Phe 1.00(1); 回収率78.0%。尚、用いたアミノペプチダーゼMはアルギニン酸化活性を含むため、アルギニンの1部がシトルリンに変化しプロリンの位置に現われる。リシンとプロリンの値が低いのは、-Lys-Pro-結合の切断が不完全のためと思われる。グルタミンはスレオニンと重複するので、スレオニンとして定量されている。また、ここに得られたオクタデカペプチドを逆相高速液体クロマトグラフィー(逆相HPLC)で調べたところ、満足すべき純度であることが示された(図2)。なおクロマトグラフィーの条件は: カラム, ヌクレオシル5C₁₈(商品名マケリー・ナーゲル社), 0.4×25cm; 溶出液, アセトニトリル11%, 硫酸ナトリウム

参考例

抗[Asp²⁴]-IGF-I-(24-41)抗体の作製

実施例1で得られたオクタデカペプチド(1)水溶液(191μg/4μl)に牛アルブミン水溶液(241μg/8μl)およびEDC水溶液(249/6μl)を加え、pH4.5に調整後2時間攪拌する。透析を5回したのち凍結乾燥し、牛アルブミン結合オクタデカペプチド(1)331μgを得る。牛血清アルブミン1モルあたりのオクタデカペプチド(1)の結合モル数はアミノ酸分析値より7.8モルであつた。

上記凍結乾燥粉末54μgを0.9%塩化ナトリウム水溶液6μlに溶解し、同量のフロイドのコンブリートアジュバンドを加え乳剤を調製する。家兎(J.W.系雄)の背部に20ヶ所に分けて乳剤1μlを、3週間間隔で6回皮下投与する。最終投与10日後に頸動脈よりカニユーレを用いて全採血し、血清にアジ化ナトリウムを1μg/mlの割合で添加し凍結保存する。

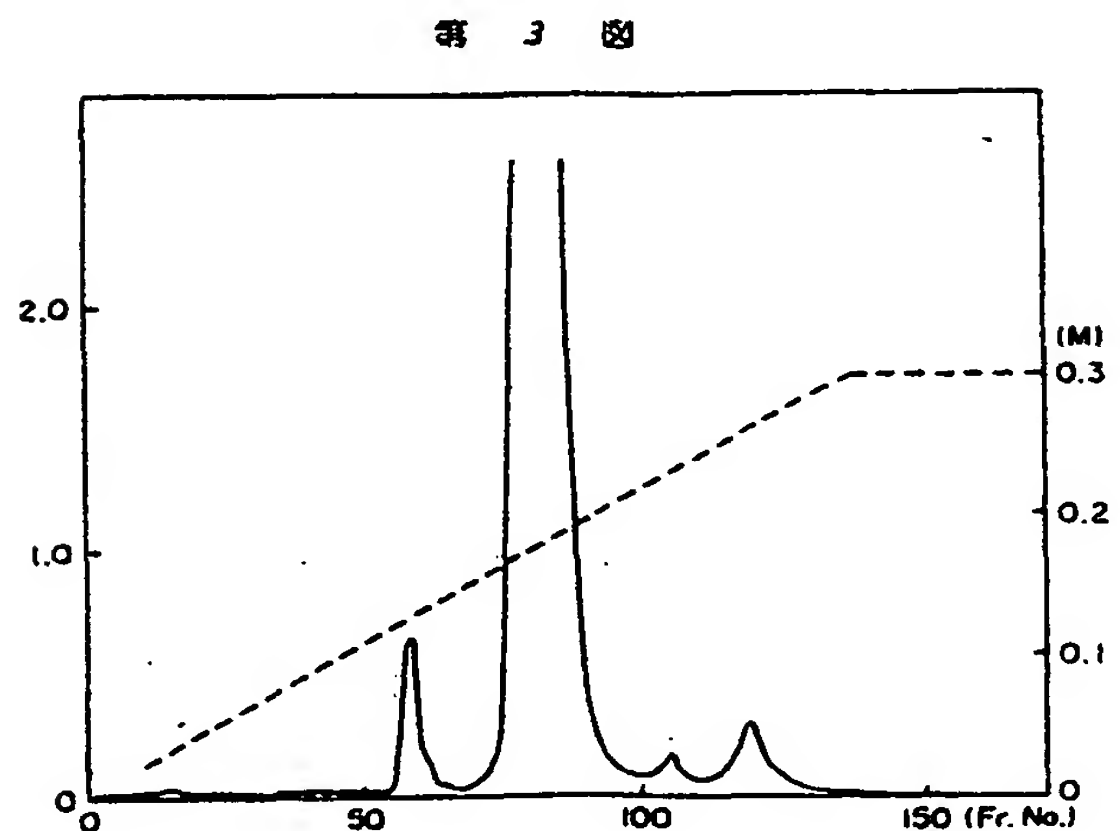
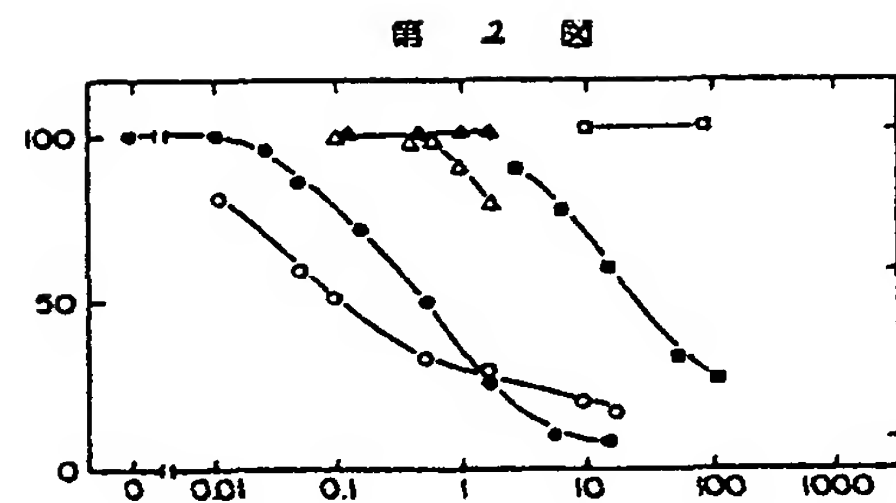
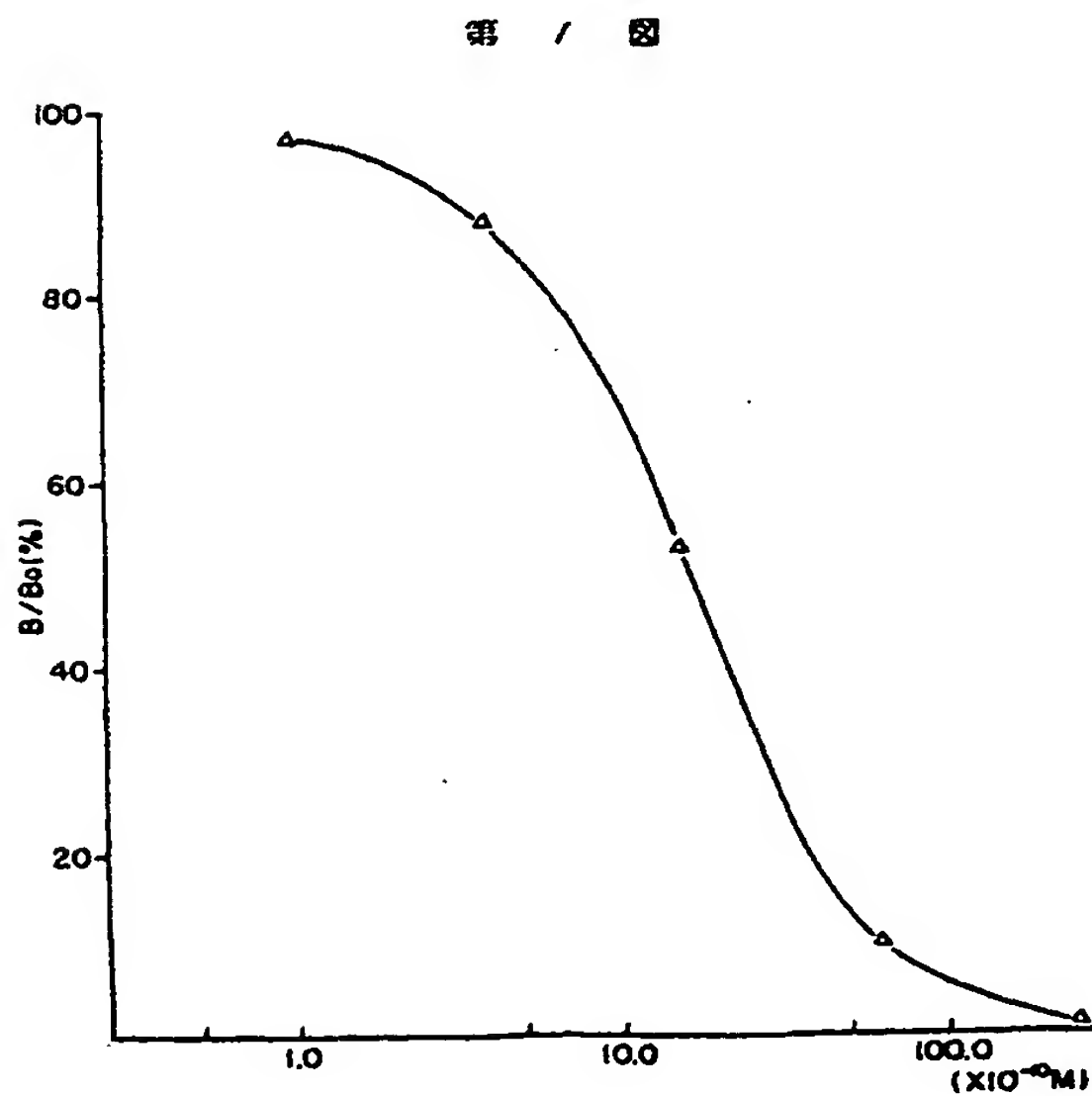
4 図面の簡単な説明

図1は本発明の ^{125}I 標識オクタデカペプチド(1)を用いた標準曲線を示し、縦軸は $B/B_0(\%)$ 、横軸はオクタデカペプチド濃度($\times 10^{-10}\text{M}$)を表わす。図2は同標識物およびIGF-I-(30-41)(○-○)、オクタデカペプチド(1)(—●)、IGF-I(△-△)、IGF-II(▲-▲)、MSAおよびインシュリン(□-□)およびソマトメジンA(■-■)を用いたラジオイムノアッセイの結果を示し、縦軸は $B/B_0(\%)$ 、横軸はオクタデカペプチド(1)の濃度(pmole/tube)を表わす。図3は粗オクタデカペプチド(1)のメチルセルローズカラムを用いたカラムクロマトグラフィーの結果を示し、左縦軸は275nmの吸収、右縦軸は酢酸アンモニウムの濃度(M)、横軸は画分番号を示す。図4はオクタデカペプチド(1)の逆相高速流体クロマトグラフィーの結果を示し、横軸は保持時間を示す。図5は ^{125}I 標識オクタペプチドのゲル濾過クロマトグラフィーの結果を示し、縦軸は放射活性(μCi)、横軸は画分番号を示す。

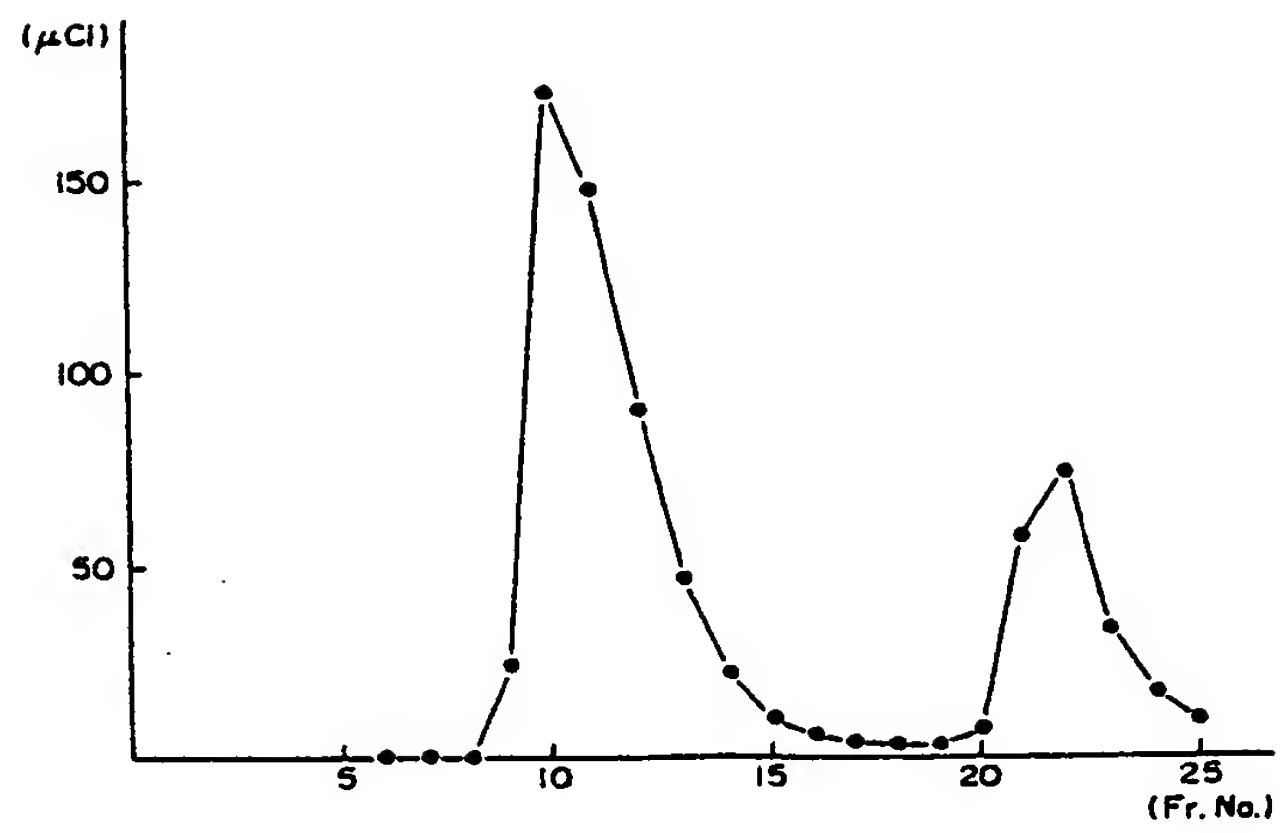
す。

特許出願人 塩野義製薬株式会社

代理人 弁理士 岩崎 光隆



第 4 図



第1頁の続き

⑤Int. Cl. 4

// G 01 N 33/68
C 07 K 99:26

識別記号

庁内整理番号

8305-2G

手続補正書(方式)

特開昭60-109599(12)

昭和59年10月1日

特許庁長官 殿



1. 事件の表示

昭和58年特許願第89774号

2. 発明の名称

インスリン様成長因子-I(IGF-I)測定用ペプチド

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 大阪府大阪市東区道修町3丁目12番地

名称 (192) シオノギセイヤク 塩野製薬株式会社

代表者 ヨシトシ カズオ
吉 利 一 雄

4. 代理人

住所 大阪市福島区豊洲5丁目12番4号 7553

塩野製薬株式会社 特許部

(電話 06-458-5861)

氏名 弁理士(6703) 岩 崎 光



5. 補正命令の日付

昭和59年 9月25日(発送日) 特許

6. 補正の対象

明細書の図面の簡単な説明の欄。

7. 補正の内容

明細書33頁下から5行目から3行目の「オクタデカ……」を示す。図5は」を削除する。

以 上